

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 101 33 426.5
Anmeldetag: 10. Juli 2001
Anmelder/Inhaber: Degussa AG, Düsseldorf/DE
Bezeichnung: Für das sigC-Gen kodierende Nukleotidsequenzen
Priorität: 02.09.2000 DE 100 43 332.4
IPC: C 12 N, C 07 H, C 12 Q

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 27. September 2001
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Ebert

Für das sigC-Gen kodierende Nukleotidsequenzen

Gegenstand der Erfindung sind für das sigC-Gen kodierende Nukleotidsequenzen aus coryneformen Bakterien und ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren
5 unter Verwendung von Bakterien, in denen das sigC-Gen verstärkt wird.

Stand der Technik

L-Aminosäuren finden in der Humanmedizin und in der pharmazeutischen Industrie, in der Lebensmittelindustrie
10 und ganz besonders in der Tierernährung, Anwendung.

Es ist bekannt, daß Aminosäuren durch Fermentation von Stämmen coryneformer Bakterien, insbesondere Corynebacterium glutamicum, hergestellt werden. Wegen der großen Bedeutung wird ständig an der Verbesserung der Herstellverfahren gearbeitet. Verfahrensverbesserungen
15 können fermentationstechnische Maßnahmen wie zum Beispiel Rührung und Versorgung mit Sauerstoff, oder die Zusammensetzung der Nährmedien wie zum Beispiel die Zuckerkonzentration während der Fermentation, oder die
20 Aufarbeitung zur Produktform durch zum Beispiel Ionenaustauschchromatographie oder die intrinsischen Leistungseigenschaften des Mikroorganismus selbst betreffen.

Zur Verbesserung der Leistungseigenschaften dieser
25 Mikroorganismen werden Methoden der Mutagenese, Selektion und Mutantenauswahl angewendet. Auf diese Weise erhält man Stämme, die resistent gegen Antimetabolite oder auxotroph für regulatorisch bedeutsame Metabolite sind und Aminosäuren produzieren.

30 Seit einigen Jahren werden ebenfalls Methoden der rekombinanten DNA-Technik zur Stammverbesserung von L-Aminosäure produzierenden Stämmen von Corynebacterium eingesetzt, indem man einzelne Aminosäure-Biosynthesegene

amplifiziert und die Auswirkung auf die Aminosäure-Produktion untersucht.

Aufgabe der Erfindung

Die Erfinder haben sich zur Aufgabe gestellt, neue
5 Maßnahmen zur verbesserten fermentativen Herstellung von Aminosäuren bereitzustellen.

Beschreibung der Erfindung

Werden im folgenden L-Aminosäuren oder Aminosäuren erwähnt,
sind damit eine oder mehrere Aminosäuren einschließlich
10 ihrer Salze, ausgewählt aus der Gruppe L-Asparagin, L-Threonin, L-Serin, L-Glutamat, L-Glycin, L-Alanin, L-Cystein, L-Valin, L-Methionin, L-Isoleucin, L-Leucin, L-Tyrosin, L-Phenylalanin, L-Histidin, L-Lysin, L-Tryptophan und L-Arginin gemeint. Besonders bevorzugt ist Lysin.

15 Gegenstand der Erfindung ist ein isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterien, enthaltend eine für das sigC-Gen kodierende Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe

a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit
20 einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,

b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70%
25 identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,

c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und

d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz
30 von a), b) oder c),

wobei das Polypeptid bevorzugt die Aktivität des Sigma-Faktors C aufweist.

Gegenstand der Erfindung ist ebenfalls das oben genannte Polynukleotid, wobei es sich bevorzugt um eine
5 replizierbare DNA handelt, enthaltend:

- (i) die Nukleotidsequenz, gezeigt in SEQ ID No. 1, oder
- (ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz (i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des
10 genetischen Kodes entspricht, oder
- (iii) mindestens eine Sequenz, die mit der zur Sequenz (i) oder (ii) komplementären Sequenz hybridisiert, und gegebenenfalls
- (iv) funktionsneutralen Sinnmutationen in (i).

15 Weitere Gegenstände sind

ein replizierbares Polynukleotid, insbesondere DNA, enthaltend die Nukleotidsequenz wie in SEQ ID No. 1 dargestellt;

ein Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die
20 Aminosäuresequenz, wie in SEQ ID No. 2 dargestellt, enthält;

ein Vektor, enthaltend das erfindungsgemäße Polynukleotid, insbesondere Pendelvektor oder Plasmidvektor, und

coryneforme Bakterien, die den Vektor enthalten oder in
25 denen das sigC-Gen verstärkt ist.

Gegenstand der Erfindung sind ebenso Polynukleotide, die im wesentlichen aus einer Polynukleotidsequenz bestehen, die erhältlich sind durch Screening mittels Hybridisierung einer entsprechenden Genbank eines coryneformen Bakteriums,

die das vollständige Gen oder Teile davon enthält, mit einer Sonde, die die Sequenz des erfindungsgemäßen Polynukleotids gemäß SEQ ID No.1 oder ein Fragment davon enthält und Isolierung der genannten Polynukleotidsequenz.

- 5 Polynukleotide, die die Sequenzen gemäß der Erfindung enthalten, sind als Hybridisierungs-Sonden für RNA, cDNA und DNA geeignet, um Nukleinsäuren beziehungsweise Polynukleotide oder Gene in voller Länge zu isolieren, die für den Sigma-Faktor C kodieren, oder um solche
- 10 Nukleinsäuren beziehungsweise Polynukleotide oder Gene zu isolieren, die eine hohe Ähnlichkeit der Sequenz mit der des sigC-Gens aufweisen. Sie sind ebenso zum Einbau in sogenannte „arrays“, „micro arrays“ oder „DNA chips“ geeignet, um die entsprechenden Polynukleotide zu
- 15 detektieren und zu bestimmen.

- Polynukleotide, die die Sequenzen gemäß der Erfindung enthalten, sind weiterhin als Primer geeignet, mit deren Hilfe mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) DNA von Genen hergestellt werden kann, die für den Sigma-Faktor C
- 20 kodieren.

- Solche als Sonden oder Primer dienende Oligonukleotide, enthalten mindestens 25, 26, 27, 28, 29 oder 30, bevorzugt mindestens 20, 21, 22, 23 oder 24, ganz besonders bevorzugt mindestens 15, 16, 17, 18 oder 19 aufeinanderfolgende
- 25 Nukleotide. Geeignet sind ebenfalls Oligonukleotide mit einer Länge von mindestens 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 oder 40, oder mindestens 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 oder 50 Nukleotiden. Gegebenenfalls sind auch Oligonukleotide mit einer Länge von mindestens 100, 150,
- 30 200, 250 oder 300 Nukleotiden geeignet.

„Isoliert“ bedeutet aus seinem natürlichen Umfeld herausgetrennt.

„Polynukleotid“ bezieht sich im allgemeinen auf Polyribonukleotide und Polydeoxyribonukleotide, wobei es sich um nicht modifizierte RNA oder DNA oder modifizierte RNA oder DNA handeln kann.

- 5 Die Polynukleotide gemäß Erfindung schließen ein Polynukleotid gemäß SEQ ID No. 1 oder ein daraus hergestelltes Fragment und auch solche ein, die zu wenigstens 70% bis 80%, bevorzugt zu wenigstens 81% bis 85%, besonders bevorzugt zu wenigstens 86% bis 90%, und
10 ganz besonders bevorzugt zu wenigstens 91%, 93%, 95%, 97% oder 99% identisch sind mit dem Polynukleotid gemäß SEQ ID No. 1 oder eines daraus hergestellten Fragments.

- Unter „Polypeptiden“ versteht man Peptide oder Proteine, die zwei oder mehr über Peptidbindungen verbundene
15 Aminosäuren enthalten.

- Die Polypeptide gemäß Erfindung schließen ein Polypeptid gemäß SEQ ID No. 2, insbesondere solche mit der biologischen Aktivität des Sigma-Faktors C und auch solche ein, die zu wenigstens 70% bis 80%, bevorzugt zu wenigstens
20 81% bis 85%, besonders bevorzugt zu wenigstens 86% bis 90%, und ganz besonders bevorzugt zu wenigstens 91%, 93%, 95%, 97% oder 99% identisch sind mit dem Polypeptid gemäß SEQ ID No. 2 und die genannte Aktivität aufweisen.

- Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur
25 fermentativen Herstellung von Aminosäuren, ausgewählt aus der Gruppe L-Asparagin, L-Threonin, L-Serin, L-Glutamat, L-Glycin, L-Alanin, L-Cystein, L-Valin, L-Methionin, L-Isoleucin, L-Leucin, L-Tyrosin, L-Phenylalanin, L-Histidin, L-Lysin, L-Tryptophan und L-
30 Arginin, unter Verwendung von coryneformen Bakterien, die insbesondere bereits Aminosäuren produzieren und in denen die für das sigC-Gen kodierenden Nukleotidsequenzen verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.

Der Begriff "Verstärkung" beschreibt in diesem Zusammenhang die Erhöhung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise die Kopienzahl des Gens bzw. der Gene erhöht, einen starken Promotor verwendet oder ein Gen verwendet, das für ein entsprechendes Enzym mit einer hohen Aktivität kodiert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

Durch die Maßnahmen der Verstärkung, insbesondere Überexpression, wird die Aktivität oder Konzentration des entsprechenden Proteins im allgemeinen um mindestens 10%, 25%, 50%, 75%, 100%, 150%, 200%, 300%, 400% oder 500%, maximal bis 1000% oder 2000% bezogen auf die des Wildtyp-Proteins beziehungsweise der Aktivität oder Konzentration des Proteins im Ausgangs-Mikroorganismus erhöht.

Die Mikroorganismen, die Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind, können L-Aminosäuren aus Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke, Cellulose oder aus Glycerin und Ethanol herstellen. Es kann sich um Vertreter coryneformer Bakterien insbesondere der Gattung *Corynebacterium* handeln. Bei der Gattung *Corynebacterium* ist insbesondere die Art *Corynebacterium glutamicum* zu nennen, die in der Fachwelt für ihre Fähigkeit bekannt ist, L-Aminosäuren zu produzieren.

Geeignete Stämme der Gattung *Corynebacterium*, insbesondere der Art *Corynebacterium glutamicum* (*C. glutamicum*), sind besonders die bekannten Wildtypstämme

Corynebacterium glutamicum ATCC13032
Corynebacterium acetoglutamicum ATCC15806
Corynebacterium acetoacidophilum ATCC13870
Corynebacterium thermoaminogenes FERM BP-1539
Corynebacterium melassecola ATCC17965
Brevibacterium flavum ATCC14067

Brevibacterium lactofermentum ATCC13869 und
Brevibacterium divaricatum ATCC14020

und daraus hergestellte L-Aminosäuren produzierende
Mutanten bzw. Stämme.

- 5 Den Erfindern gelang es, das neue, für das Enzym Sigma-
Faktor C kodierende sigC-Gen von *C. glutamicum* zu
isolieren.

- Zur Isolierung des sigC-Gens oder auch anderer Gene von
C. glutamicum wird zunächst eine Genbank dieses
10 Mikroorganismus in *Escherichia coli* (*E. coli*) angelegt.
Das Anlegen von Genbanken ist in allgemein bekannten
Lehrbüchern und Handbüchern niedergeschrieben. Als Beispiel
seien das Lehrbuch von Winnacker: Gene und Klone, Eine
Einführung in die Gentechnologie (Verlag Chemie, Weinheim,
15 Deutschland, 1990), oder das Handbuch von Sambrook et al.:
Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor
Laboratory Press, 1989) genannt. Eine sehr bekannte Genbank
ist die des *E. coli* K-12 Stammes W3110, die von Kohara et
al. (Cell 50, 495-508 (1987)) in λ -Vektoren angelegt wurde.
20 Bathe et al. (Molecular and General Genetics, 252:255-265,
1996) beschreiben eine Genbank von *C. glutamicum* ATCC13032,
die mit Hilfe des Cosmidvektors SuperCos I (Wahl et al.,
1987, Proceedings of the National Academy of Sciences USA,
84:2160-2164) im *E. coli* K-12 Stamm NM554 (Raleigh et al.,
25 1988, Nucleic Acids Research 16:1563-1575) angelegt wurde.

Börmann et al. (Molecular Microbiology 6(3), 317-326
(1992)) wiederum beschreiben eine Genbank von *C. glutamicum*
ATCC13032 unter Verwendung des Cosmids pHc79 (Hohn und
Collins, Gene 11, 291-298 (1980)).

- 30 Zur Herstellung einer Genbank von *C. glutamicum* in *E. coli*
können auch Plasmide wie pBR322 (Bolivar, Life Sciences,
25, 807-818 (1979)) oder pUC9 (Vieira et al., 1982, Gene,
19:259-268) verwendet werden. Als Wirte eignen sich

besonders solche E. coli Stämme, die restriktions- und rekombinationsdefekt sind. Ein Beispiel hierfür ist der Stamm DH5 α mc r , der von Grant et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 87 (1990) 4645-4649) beschrieben wurde. Die mit Hilfe von Cosmiden klonierten langen DNA-Fragmente können anschließend wiederum in gängige, für die Sequenzierung geeignete Vektoren subkloniert und anschließend sequenziert werden, so wie es z.B. bei Sanger et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 74:5463-5467, 1977) beschrieben ist.

Die erhaltenen DNA-Sequenzen können dann mit bekannten Algorithmen bzw. Sequenzanalyse-Programmen wie z.B. dem von Staden (Nucleic Acids Research 14, 217-232(1986)), dem von Marck (Nucleic Acids Research 16, 1829-1836 (1988)) oder dem GCG-Programm von Butler (Methods of Biochemical Analysis 39, 74-97 (1998)) untersucht werden.

Auf diese Weise wurde die neue für das Gen sigC kodierende DNA-Sequenz von C. glutamicum erhalten, die als SEQ ID No. 1 Bestandteil der vorliegenden Erfindung ist. Weiterhin wurde aus der vorliegenden DNA-Sequenz mit den oben beschriebenen Methoden die Aminosäuresequenz des entsprechenden Proteins abgeleitet. In SEQ ID No. 2 ist die sich ergebende Aminosäuresequenz des sigC-Genproduktes dargestellt.

Kodierende DNA-Sequenzen, die sich aus SEQ ID No. 1 durch die Degeneriertheit des genetischen Kodes ergeben, sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung. In gleicher Weise sind DNA-Sequenzen, die mit SEQ ID No. 1 oder Teilen von SEQ ID No. 1 hybridisieren, Bestandteil der Erfindung. In der Fachwelt sind weiterhin konservative Aminosäureaustausche wie z.B. Austausch von Glycin gegen Alanin oder von Asparaginsäure gegen Glutaminsäure in Proteinen als „Sinnmutationen“ (sense mutations) bekannt, die zu keiner grundsätzlichen Veränderung der Aktivität des Proteins

führen, d.h. funktionsneutral sind. Weiterhin ist bekannt, daß Änderungen am N- und/oder C-Terminus eines Proteins dessen Funktion nicht wesentlich beeinträchtigen oder sogar stabilisieren können. Angaben hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Ben-Bassat et al. (Journal of Bacteriology 169:751-757 (1987)), bei O'Regan et al. (Gene 77:237-251 (1989)), bei Sahin-Toth et al. (Protein Sciences 3:240-247 (1994)), bei Hochuli et al. (Bio/Technology 6:1321-1325 (1988)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie. Aminosäuresequenzen, die sich in entsprechender Weise aus SEQ ID No. 2 ergeben, sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung.

In gleicher Weise sind DNA-Sequenzen, die mit SEQ ID No. 1 oder Teilen von SEQ ID No. 1 hybridisieren Bestandteil der Erfindung. Schließlich sind DNA-Sequenzen Bestandteil der Erfindung, die durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unter Verwendung von Primern hergestellt werden, die sich aus SEQ ID No. 1 ergeben. Derartige Oligonukleotide haben typischerweise eine Länge von mindestens 15 Nukleotiden.

Anleitungen zur Identifizierung von DNA-Sequenzen mittels Hybridisierung findet der Fachmann unter anderem im Handbuch "The DIG System Users Guide for Filter Hybridization" der Firma Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Deutschland, 1993) und bei Liebl et al.

(International Journal of Systematic Bacteriology (1991) 41: 255-260). Die Hybridisierung findet unter stringenten Bedingungen statt, das heisst, es werden nur Hybride gebildet, bei denen Sonde und Zielsequenz, d. h. die mit der Sonde behandelten Polynukleotide, mindestens 70% identisch sind. Es ist bekannt, dass die Stringenz der Hybridisierung einschließlich der Waschschriffe durch Variieren der Pufferzusammensetzung, der Temperatur und der Salzkonzentration beeinflusst bzw. bestimmt wird. Die Hybridisierungsreaktion wird vorzugsweise bei relativ niedriger Stringenz im Vergleich zu den Waschschriffen

durchgeführt (Hybaid Hybridisation Guide, Hybaid Limited, Teddington, UK, 1996).

Für die Hybridisierungsreaktion kann beispielsweise ein 5x SSC-Puffer bei einer Temperatur von ca. 50 - 68°C eingesetzt werden. Dabei können Sonden auch mit Polynukleotiden hybridisieren, die weniger als 70% Identität zur Sequenz der Sonde aufweisen. Solche Hybride sind weniger stabil und werden durch Waschen unter stringenten Bedingungen entfernt. Dies kann beispielsweise durch Senken der Salzkonzentration auf 2x SSC und gegebenenfalls nachfolgend 0,5x SSC (The DIG System User's Guide for Filter Hybridisation, Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland, 1995) erreicht werden, wobei eine Temperatur von ca. 50 - 68°C eingestellt wird. Es ist gegebenenfalls möglich die Salzkonzentration bis auf 0,1x SSC zu senken. Durch schrittweise Erhöhung der Hybridisierungstemperatur in Schritten von ca. 1 - 2°C von 50 auf 68°C können Polynukleotidfragmente isoliert werden, die beispielsweise mindestens 70% oder mindestens 80% oder mindestens 90% bis 95% Identität zur Sequenz der eingesetzten Sonde besitzen. Weitere Anleitungen zur Hybridisierung sind in Form sogenannter Kits am Markt erhältlich (z.B. DIG Easy Hyb von der Firma Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland, Catalog No. 1603558).

Anleitungen zur Amplifikation von DNA-Sequenzen mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) findet der Fachmann unter anderem im Handbuch von Gait: Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach (IRL Press, Oxford, UK, 1984) und bei Newton und Graham: PCR (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Deutschland, 1994).

Bei der Arbeit an der vorliegenden Erfindung konnte festgestellt werden, daß coryneforme Bakterien nach Überexpression des sigC-Gens in verbesserter Weise Aminosäuren produzieren.

Zur Erzielung einer Überexpression kann die Kopienzahl der entsprechenden Gene erhöht werden, oder es kann die Promotor- und Regulationsregion oder die Ribosomenbindungsstelle, die sich stromaufwärts des Strukturgens befindet, mutiert werden. In gleicher Weise wirken Expressionskassetten, die stromaufwärts des Strukturgens eingebaut werden. Durch induzierbare Promotoren ist es zusätzlich möglich, die Expression im Verlaufe der fermentativen Aminosäure-Produktion zu steigern. Durch Maßnahmen zur Verlängerung der Lebensdauer der m-RNA wird ebenfalls die Expression verbessert. Weiterhin wird durch Verhinderung des Abbaus des Enzymproteins ebenfalls die Enzymaktivität verstärkt. Die Gene oder Genkonstrukte können entweder in Plasmiden mit unterschiedlicher Kopienzahl vorliegen oder im Chromosom integriert und amplifiziert sein. Alternativ kann weiterhin eine Überexpression der betreffenden Gene durch Veränderung der Medienzusammensetzung und Kulturführung erreicht werden.

Anleitungen hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Martin et al. (Bio/Technology 5, 137-146 (1987)), bei Guerrero et al. (Gene 138, 35-41 (1994)), Tsuchiya und Morinaga (Bio/Technology 6, 428-430 (1988)), bei Eikmanns et al. (Gene 102, 93-98 (1991)), in der Europäischen Patentschrift 0 472 869, im US Patent 4,601,893, bei Schwarzer und Pühler (Bio/Technology 9, 84-87 (1991)), bei Reinscheid et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 126-132 (1994)), bei LaBarre et al. (Journal of Bacteriology 175, 1001-1007 (1993)), in der Patentanmeldung WO 96/15246, bei Malumbres et al. (Gene 134, 15 - 24 (1993)), in der japanischen Offenlegungsschrift JP-A-10-229891, bei Jensen und Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58, 191-195 (1998)), bei Makrides (Microbiological Reviews 60:512-538 (1996)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie.

Zur Verstärkung wurde das erfindungsgemäße sigC-Gen beispielhaft mit Hilfe von episomalen Plasmiden überexprimiert. Als Plasmide eignen sich solche, die in coryneformen Bakterien repliziert werden. Zahlreiche bekannte Plasmidvektoren wie z.B. pZ1 (Menkel et al., Applied and Environmental Microbiology (1989) 64: 549-554), pEKEx1 (Eikmanns et al., Gene 102:93-98 (1991)) oder pHS2-1 (Sonnen et al., Gene 107:69-74 (1991)) beruhen auf den kryptischen Plasmiden pHM1519, pBL1 oder pGA1. Andere Plasmidvektoren wie z.B. solche, die auf pCG4 (US-A 4,489,160), oder pNG2 (Serwold-Davis et al., FEMS Microbiology Letters 66, 119-124 (1990)), oder pAG1 (US-A 5,158,891) beruhen, können in gleicher Weise verwendet werden.

Weiterhin eignen sich auch solche Plasmidvektoren mit Hilfe derer man das Verfahren der Genamplifikation durch Integration in das Chromosom anwenden kann, so wie es beispielsweise von Reinscheid et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 126-132 (1994)) zur Duplikation bzw. Amplifikation des hom-thrB-Operons beschrieben wurde. Bei dieser Methode wird das vollständige Gen in einen Plasmidvektor kloniert, der in einem Wirt (typischerweise E. coli), nicht aber in C. glutamicum replizieren kann. Als Vektoren kommen beispielsweise pSUP301 (Simon et al., Bio/Technology 1, 784-791 (1983)), pK18mob oder pK19mob (Schäfer et al., Gene 145, 69-73 (1994)), pGEM-T (Promega corporation, Madison, WI, USA), pCR2.1-TOPO (Shuman (1994). Journal of Biological Chemistry 269:32678-84; US-A 5,487,993), pCR®Blunt (Firma Invitrogen, Groningen, Niederlande; Bernard et al., Journal of Molecular Biology, 234: 534-541 (1993)), pEM1 (Schrumpf et al, 1991, Journal of Bacteriology 173:4510-4516) oder pBGS8 (Spratt et al., 1986, Gene 41: 337-342) in Frage. Der Plasmidvektor, der das zu amplifizierende Gen enthält, wird anschließend durch Konjugation oder Transformation in den gewünschten Stamm von C. glutamicum überführt. Die Methode

der Konjugation ist beispielsweise bei Schäfer et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 756-759 (1994)) beschrieben. Methoden zur Transformation sind beispielsweise bei Thierbach et al. (Applied Microbiology and Biotechnology 29, 356-362 (1988)), Dunican und Shivnan (Bio/Technology 7, 1067-1070 (1989)) und Tauch et al. (FEMS Microbiological Letters 123, 343-347 (1994)) beschrieben. Nach homologer Rekombination mittels eines "cross over"-Ereignisses enthält der resultierende Stamm mindestens zwei Kopien des betreffenden Gens.

Zusätzlich kann es für die Produktion von L-Aminosäuren vorteilhaft sein, neben dem sigC-Gen eines oder mehrere Enzyme des jeweiligen Biosyntheseweges, der Glykolyse, der Anaplerotik, des Zitronensäure-Zyklus, des Pentosephosphat-Zyklus, des Aminosäure-Exports und gegebenenfalls regulatorische Proteine zu verstärken, insbesondere überzuexprimieren.

So kann beispielsweise für die Herstellung von L-Aminosäuren zusätzlich zur Verstärkung des sigC-Gens eines oder mehrere Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- das für die Dihydrodipicolinat-Synthase kodierende Gen *dapA* (EP-B 0 197 335),
- das für die Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase kodierende Gen *gap* (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- das für die Triosephosphat Isomerase kodierende Gen *tpi* (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- das für die 3-Phosphoglycerat Kinase kodierende Gen *pgk* (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- das für die Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase kodierende Gen *zwf* (JP-A-09224661),

- das für die Pyruvat Carboxylase kodierende Gen pyc (DE-A-198 31 609),
 - das für die Malat-Chinon-Oxidoreduktase kodierende Gen mgo (Molenaar et al., European Journal of Biochemistry
5 254, 395-403 (1998)),
 - das für eine feed-back resistente Aspartatkinase kodierende Gen lysC (Accession No.P26512; EP-B-0387527; EP-A-0699759),
 - das für den Lysin-Export kodierende Gen lysE
10 (DE-A-195 48 222),
 - das für die Homoserin-Dehydrogenase kodierende Gen hom (EP-A 0131171),
 - das für die Threonin-Dehydratase kodierende Gen ilvA (Möckel et al., Journal of Bacteriology (1992) 8065-
15 8072)) oder das für eine "feed back resistente" Threonin-Dehydratase kodierende Allel ilvA(Fbr) (Möckel et al., (1994) Molecular Microbiology 13: 833-842),
 - das für die Acetohydroxysäure-Synthase kodierenden Gen ilvBN (EP-B 0356739),
 - das für die Dihydroxysäuredehydratase kodierende Gen ilvD
20 (Sahm und Eggeling (1999) Applied and Environmental Microbiology 65: 1973-1979),
 - das für das Zwa1-Protein kodierende Gen zwa1 (DE: 19959328.0, DSM 13115)
- 25 verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.

Weiterhin kann es für die Produktion von L-Aminosäuren vorteilhaft sein, zusätzlich zur Verstärkung des sigC-Gens eines oder mehrere Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodierende Gen *pck* (DE 199 50 409.1; DSM 13047),
- das für die Glucose-6-Phosphat Isomerase kodierende Gen *pgi* (US 09/396,478; DSM 12969),
- 5 • das für die Pyruvat-Oxidase kodierende Gen *poxB* (DE: 1995 1975.7; DSM 13114),
- das für das Zwa2-Protein kodierende Gen *zwa2* (DE: 19959327.2, DSM 13113)

abzuschwächen, insbesondere die Expression zu verringern.

10 Der Begriff „Abschwächung“ beschreibt in diesem Zusammenhang die Verringerung oder Ausschaltung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme (Proteine) in einem Mikroorganismus, die durch die
15 entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise einen schwachen Promotor verwendet oder ein Gen bzw. Allel verwendet, das für ein entsprechendes Enzym mit einer niedrigen Aktivität kodiert bzw. das entsprechende Gen oder Enzym (Protein) inaktiviert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

20 Durch die Maßnahmen der Abschwächung wird die Aktivität oder Konzentration des entsprechenden Proteins im allgemeinen auf 0 bis 75%, 0 bis 50%, 0 bis 25%, 0 bis 10% oder 0 bis 5% der Aktivität oder Konzentration des Wildtyp-Proteins, beziehungsweise der Aktivität oder Konzentration
25 des Proteins im Ausgangs-Mikroorganismus, herabgesenkt.

Weiterhin kann es für die Produktion von Aminosäuren vorteilhaft sein, neben der Überexpression des *sigC*-Gens unerwünschte Nebenreaktionen auszuschalten (Nakayama: “Breeding of Amino Acid Producing Micro-organisms”, in:
30 Overproduction of Microbial Products, Krumphanzl, Sikyta, Vanek (eds.), Academic Press, London, UK, 1982).

Die erfindungsgemäß hergestellten Mikroorganismen sind ebenfalls Gegenstand der Erfindung und können kontinuierlich oder diskontinuierlich im batch - Verfahren (Satzkultivierung) oder im fed batch (Zulaufverfahren) oder repeated fed batch Verfahren (repetitives Zulaufverfahren) zum Zwecke der Produktion von Aminosäuren kultiviert werden. Eine Zusammenfassung über bekannte Kultivierungsmethoden ist im Lehrbuch von Chmiel (Bioprozeßtechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) oder im Lehrbuch von Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) beschrieben.

Das zu verwendende Kulturmedium muß in geeigneter Weise den Ansprüchen der jeweiligen Stämme genügen. Beschreibungen von Kulturmedien verschiedener Mikroorganismen sind im Handbuch "Manual of Methods for General Bacteriology" der American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981) enthalten.

Als Kohlenstoffquelle können Zucker und Kohlehydrate wie z.B. Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke und Cellulose, Öle und Fette wie z.B. Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnußöl und Kokosfett, Fettsäuren wie z.B. Palmitinsäure, Stearinsäure und Linolsäure, Alkohole wie z.B. Glycerin und Ethanol und organische Säuren wie z.B. Essigsäure verwendet werden. Diese Stoffe können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

Als Stickstoffquelle können organische Stickstoff-haltige Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff oder anorganische Verbindungen wie Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und Ammoniumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

Als Phosphorquelle können Phosphorsäure, Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium haltigen Salze verwendet werden. Das Kulturmedium muß weiterhin Salze von Metallen enthalten wie
5 z.B. Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind. Schließlich können essentielle Wuchsstoffe wie Aminosäuren und Vitamine zusätzlich zu den oben genannten Stoffen eingesetzt werden. Dem Kulturmedium können überdies geeignete Vorstufen zugesetzt werden. Die
10 genannten Einsatzstoffe können zur Kultur in Form eines einmaligen Ansatzes hinzugegeben oder in geeigneter Weise während der Kultivierung zugefüttert werden.

Zur pH-Kontrolle der Kultur werden basische Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak bzw.
15 Ammoniakwasser oder saure Verbindungen wie Phosphorsäure oder Schwefelsäure in geeigneter Weise eingesetzt. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel wie z.B. Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem
20 Medium geeignete selektiv wirkende Stoffe wie z.B. Antibiotika hinzugefügt werden. Um aerobe Bedingungen aufrechtzuerhalten, werden Sauerstoff oder Sauerstoff haltige Gasmischungen wie z.B. Luft in die Kultur eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise
25 bei 20°C bis 45°C und vorzugsweise bei 25°C bis 40°C. Die Kultur wird solange fortgesetzt, bis sich ein Maximum des gewünschten Produktes gebildet hat. Dieses Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden erreicht.

30 Methoden zur Bestimmung von L-Aminosäuren sind aus dem Stand der Technik bekannt. Die Analyse kann zum Beispiel so wie bei Spackman et al. (Analytical Chemistry, 30, (1958), 1190) beschrieben durch Ionenaustausch-Chromatographie mit anschließender Ninhydrin-Derivatisierung erfolgen, oder sie
35 kann durch reversed phase HPLC erfolgen, so wie bei

Lindroth et al. (Analytical Chemistry (1979) 51: 1167-1174) beschrieben.

Das erfindungsgemäße Verfahren dient zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren.

5 Folgende Mikroorganismen wurden als Reinkultur bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) gemäß Budapester Vertrag hinterlegt:

- 10 • Escherichia coli DH5 α mc/pEC-XK99EsigCb2ex als DSM 14375 am 29. Juni 2001
- Corynebacterium glutamicum DSM5715/pEC-XK99E als DSM 13455 am 17. April 2000.

Die vorliegende Erfindung wird im folgenden anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert.

15 Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Escherichia coli sowie alle Techniken zur Restriktion, Klenow- und alkalische Phosphatasebehandlung wurden nach Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual (1989) Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA)

20 durchgeführt. Methoden zur Transformation von Escherichia coli sind ebenfalls in diesem Handbuch beschrieben.

Die Zusammensetzung gängiger Nährmedien wie LB- oder TY-Medium kann ebenfalls dem Handbuch von Sambrook et al. entnommen werden.

25 Beispiel 1

Herstellung einer genomischen Cosmid-Genbank aus Corynebacterium glutamicum ATCC 13032

Chromosomale DNA aus Corynebacterium glutamicum ATCC 13032 wurde wie bei Tauch et al. (1995, Plasmid 33:168-179)

30 beschrieben isoliert und mit dem Restriktionsenzym Sau3AI

(Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung Sau3AI, Code no. 27-0913-02) partiell gespalten. Die DNA-Fragmente wurden mit shrimp alkalischer Phosphatase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland, Produktbeschreibung SAP, Code no. 1758250) dephosphoryliert. Die DNA des Cosmid-Vektors SuperCos1 (Wahl et al. (1987) Proceedings of the National Academy of Sciences USA 84:2160-2164), bezogen von der Firma Stratagene (La Jolla, USA, Produktbeschreibung SuperCos1 Cosmid Vektor Kit, Code no. 251301) wurde mit dem Restriktionsenzym XbaI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung XbaI, Code no. 27-0948-02) gespalten und ebenfalls mit shrimp alkalischer Phosphatase dephosphoryliert.

Anschließend wurde die Cosmid-DNA mit dem Restriktionsenzym BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung BamHI, Code no. 27-0868-04) gespalten. Die auf diese Weise behandelte Cosmid-DNA wurde mit der behandelten ATCC13032-DNA gemischt und der Ansatz mit T4-DNA-Ligase (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung T4-DNA-Ligase, Code no. 27-0870-04) behandelt. Das Ligationsgemisch wurde anschließend mit Hilfe des Gigapack II XL Packing Extracts (Stratagene, La Jolla, USA, Produktbeschreibung Gigapack II XL Packing Extract, Code no. 200217) in Phagen verpackt.

Zur Infektion des E. coli Stammes NM554 (Raleigh et al. 1988, Nucleic Acid Research 16:1563-1575) wurden die Zellen in 10 mM MgSO₄ aufgenommen und mit einem Aliquot der Phagensuspension vermischt. Infektion und Titerung der Cosmidbank wurden wie bei Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei die Zellen auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) mit 100 mg/l Ampicillin ausplattiert wurden. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurden rekombinante Einzelklone selektioniert.

Beispiel 2

Isolierung und Sequenzierung des sigC-Gens

Die Cosmid-DNA einer Einzelkolonie wurde mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit (Product No. 27106, Qiagen, Hilden, Germany) nach Herstellerangaben isoliert und mit dem Restriktionsenzym Sau3AI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung Sau3AI, Product No. 27-0913-02) partiell gespalten. Die DNA-Fragmente wurden mit shrimp alkalischer Phosphatase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland, Produktbeschreibung SAP, Product No. 1758250) dephosphoryliert. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung erfolgte die Isolierung der Cosmidfragmente im Größenbereich von 1500 bis 2000 bp mit dem QiaExII Gel Extraction Kit (Product No. 20021, Qiagen, Hilden, Germany).

Die DNA des Sequenziervektors pZero-1, bezogen von der Firma Invitrogen (Groningen, Niederlande, Produktbeschreibung Zero Background Cloning Kit, Product No. K2500-01), wurde mit dem Restriktionsenzym BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung BamHI, Product No. 27-0868-04) gespalten. Die Ligation der Cosmidfragmente in den Sequenziervektor pZero-1 wurde wie von Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei das DNA-Gemisch mit T4-Ligase (Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) über Nacht inkubiert wurde. Dieses Ligationsgemisch wurde anschließend in den E. coli Stamm DH5 α MCR (Grant, 1990, Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., 87:4645-4649) elektroporiert (Tauch et al. 1994, FEMS Microbiol Letters, 123:343-7) und auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) mit 50 mg/l Zeocin ausplattiert.

Die Plasmidpräparation der rekombinanten Klone erfolgte mit dem Biorobot 9600 (Product No. 900200, Qiagen, Hilden,

Deutschland). Die Sequenzierung erfolgte nach der Dideoxy-Kettenabbruch-Methode von Sanger et al. (1977, Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., 74:5463-5467) mit Modifikationen nach Zimmermann et al. (1990, Nucleic Acids Research, 18:1067). Es wurde der "RR dRhodamin Terminator Cycle Sequencing Kit" von PE Applied Biosystems (Product No. 403044, Weiterstadt, Deutschland) verwendet. Die gelelektrophoretische Auftrennung und Analyse der Sequenzierreaktion erfolgte in einem "Rotiphorese NF Acrylamid/Bisacrylamid" Gel (29:1) (Product No. A124.1, Roth, Karlsruhe, Germany) mit dem "ABI Prism 377" Sequenziergerät von PE Applied Biosystems (Weiterstadt, Deutschland).

Die erhaltenen Roh-Sequenzdaten wurden anschließend unter Anwendung des Staden-Programmpakets (1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) Version 97-0 prozessiert. Die Einzelsequenzen der pZerol-Derivate wurden zu einem zusammenhängenden Contig assembliert. Die computergestützte Kodierbereichsanalyse wurde mit dem Programm XNIP (Staden, 1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) angefertigt.

Die erhaltene Nukleotidsequenz ist in SEQ ID No. 1 dargestellt. Die Analyse der Nukleotidsequenz ergab ein offenes Leseraster von 582 Basenpaaren, welches als sigC-Gen bezeichnet wurde. Das sigC-Gen kodiert für ein Protein von 193 Aminosäuren.

Beispiel 3

Herstellung des Shuttle- Expressionsvektors pEC-XK99EsigCb2ex zur Verstärkung des sigC-Gens in *C. glutamicum*

3.1 Klonierung des sigC-Gens

Aus dem Stamm ATCC 13032 nach der Methode von Eikmanns et al. (Microbiology 140: 1817-1828 (1994)) chromosomale DNA isoliert. Aufgrund der aus Beispiel 2 für *C. glutamicum*

bekannten Sequenz des sigC-Gens wurden die folgenden Oligonukleotide für die Polymerase Kettenreaktion ausgewählt (siehe SEQ ID No. 3 und SEQ ID No. 4):

sigCex1:

5 5` ac ggt acc-ccc tac aca cct tta tgg tg 3`

sigCex2:

5` gc tct aga-gtt gac gta gct cat ctg ct 3`

Die dargestellten Primer wurden von der Firma MWG-Biotech AG (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert und nach der
10 Standard-PCR-Methode von Innis et al. (PCR protocols. A guide to methods and applications, 1990, Academic Press) mit Pwo-Polymerase der Firma Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Deutschland) die PCR Reaktion durchgeführt. Mit
Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion ermöglichen die Primer
15 die Amplifikation eines 667 bp großen DNA-Fragmentes, welches das sigC-Gen trägt. Außerdem enthält der Primer sigCex1 die Sequenz für die Schnittstelle der Restriktionsendonuklease KpnI, und der Primer sigCex2 die Schnittstelle der Restriktionsendonuklease XbaI, die in der
20 oben dargestellten Nukleotidabfolge durch Unterstreichen markiert sind.

Das 667 bp große sigC-Fragment wurde mit den Restriktionsendonukleasen KpnI und XbaI gespalten und anschließend aus dem Agarosegel mit dem QiaExII Gel
25 Extraction Kit (Product No. 20021, Qiagen, Hilden, Germany) isoliert.

3.2 Konstruktion des Shuttle - Vektors pEC-XK99E

Nach dem Stand der Technik wurde der E. coli - C. glutamicum Shuttle - Vektor pEC-XK99E konstruiert. Der
30 Vektor enthält die Replikationsregion rep des Plasmids pGA1 einschließlich des Replikationseffectors per (US-A-5,175,108; Nesvera et al., Journal of Bacteriology 179, 1525-1532 (1997)), das Kanamycin-Resistenzgen aph(3')-IIa

aus *Escherichia coli* (Beck et al. (1982), Gene 19: 327-336), den Replikationsursprung, den trc-Promotor, die Terminationsregionen T1 und T2, das lacI^q-Gen (Repressor des lac-Operons von *E. coli*) und eine

- 5 Mehrfachklonierschnittstelle (multiple cloning site, mcs) (Norlander, J.M. et al. Gene 26, 101-106 (1983)) des Plasmids pTRC99A (Amann et al. (1988), Gene 69: 301-315).

Der trc-Promotor kann durch Zugabe des Lactose-Derivates IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid) induziert werden.

- 10 Der konstruierte *E. coli* - *C. glutamicum* Shuttle - Vektor pEC-XK99E wurde mittels Elektroporation (Liebl et al., 1989, FEMS Microbiology Letters, 53:299-303) in *C. glutamicum* DSM5715 transferiert. Die Selektion der Transformanten erfolgte auf LBHIS Agar bestehend aus 18,5
15 g/l Brain-Heart Infusion Bouillon, 0,5 M Sorbitol, 5 g/l Bacto-Trypton, 2,5 g/l Bacto-Yeast-Extract, 5 g/l NaCl und 18 g/l Bacto-Agar, der mit 25 mg/l Kanamycin supplementiert worden war. Die Inkubation erfolgte für 2 Tage bei 33°C.

- Plasmid DNA wurde aus einer Transformante nach den üblichen
20 Methoden isoliert (Peters-Wendisch et al., 1998, Microbiology, 144, 915 - 927), mit der Restriktionsendonuklease HindIII geschnitten und das Plasmid durch anschließende Agarosegel-Elektrophorese überprüft.

- 25 Das so erhaltene Plasmidkonstrukt wurde als pEC-XK99E (Figur 1) bezeichnet. Der durch Elektroporation des Plasmides pEC-XK99E in den *C. glutamicum*-Stamm DSM5715 erhaltene Stamm wurde DSM5715/pEC-XK99E genannt und als DSM13455 bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und
30 Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) gemäß Budapest Vertrag hinterlegt.

3.3 Klonierung von sigC in den E. coli-C. glutamicum Shuttle Vektor pEC-XK99E

Als Vektor wurde der in Beispiel 3.2 beschriebene E. coli - C. glutamicum Shuttle-Vektor pEC-XK99E verwendet. DNA

5 dieses Plasmids wurde mit den Restriktionsenzymen KpnI und XbaI vollständig gespalten und anschließend mit shrimp alkalischer Phosphatase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland, Produktbeschreibung SAP, Product No. 1758250) dephosphoryliert.

10 Das in Beispiel 3.1 beschriebene, mittels PCR gewonnene und mit den Restriktionsendonukleasen KpnI und XbaI gespaltene ca. 650 bp große sigC-Fragment wurde mit dem vorbereiteten Vektor pEC-XK99E gemischt und der Ansatz mit T4-DNA-Ligase (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland,

15 Produktbeschreibung T4-DNA-Ligase, Code no.27-0870-04) behandelt. Der Ligationsansatz wurde in den E. coli Stamm DH5 α mc^r (Hanahan, In: DNA cloning. A practical approach. Vol. I. IRL-Press, Oxford, Washington DC, USA)

transformiert. Die Selektion von Plasmid-tragenden Zellen erfolgte durch Ausplattieren des Transformationsansatzes auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) mit 50 mg/l Kanamycin. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurden

20 rekombinante Einzelklone selektioniert. Plasmid DNA wurde aus einer Transformante mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit

25 (Product No. 27106, Qiagen, Hilden, Germany) nach Herstellerangaben isoliert und mit den Restriktionsenzymen XbaI und KpnI gespalten, um das Plasmid durch anschließende Agarosegel-Elektrophorese zu überprüfen. Das erhaltene Plasmid wurde pEC-XK99EsigCb2ex genannt. Es ist in Figur 2
30 dargestellt.

Beispiel 4

Transformation des Stammes DSM5715 mit dem Plasmid
pEC-XK99EsigCb2ex

Der Stamm DSM5715 wurde mit dem Plasmid pEC-XK99EsigCb2ex
5 unter Anwendung der von Liebl et al., (FEMS Microbiology
Letters, 53:299-303 (1989)) beschriebenen
Elektroporationsmethode transformiert. Die Selektion der
Transformanten erfolgte auf LBHIS Agar bestehend aus 18,5
g/l Brain-Heart Infusion Boullion, 0,5 M Sorbitol, 5 g/l
10 Bacto-Trypton, 2,5 g/l Bacto-Yeast-Extract, 5 g/l NaCl und
18 g/l Bacto-Agar, der mit 25 mg/l Kanamycin supplementiert
worden war. Die Inkubation erfolgte für 2 Tage bei 33°C.

Plasmid DNA wurde aus einer Transformante nach den üblichen
Methoden isoliert (Peters-Wendisch et al., 1998,
15 Microbiology, 144, 915 - 927), mit den
Restriktionsendonukleasen XbaI und KpnI geschnitten und das
Plasmid durch anschließende Agarosegel-Elektrophorese
überprüft. Der erhaltene Stamm wurde DSM5715/pEC-
XK99EsigCb2ex1 genannt.

20 Beispiel 5

Herstellung von Lysin

Der in Beispiel 4 erhaltene C. glutamicum Stamm
DSM5715/pEC-XK99EsigCb2ex wurde in einem zur Produktion von
Lysin geeigneten Nährmedium kultiviert und der Lysingehalt
25 im Kulturüberstand bestimmt.

Dazu wurde der Stamm zunächst auf Agarplatte mit dem
entsprechenden Antibiotikum (Hirn-Herz-Agar mit Kanamycin
(25 mg/l)) für 24 Stunden bei 33°C inkubiert. Ausgehend von
dieser Agarplattenkultur wurde eine Vorkultur angeimpft (10
30 ml Medium im 100 ml Erlenmeyerkolben). Als Medium für die
Vorkultur wurde das Vollmedium CgIII verwendet.

Medium Cg III

NaCl	2,5 g/l
Bacto-Pepton	10 g/l
Bacto-Yeast-Extrakt	10 g/l
Glucose (getrennt autoklaviert)	2% (w/v)

Der pH-Wert wurde auf pH 7.4
eingestellt

5 Diesem wurde Kanamycin (25 mg/l) zugesetzt. Die Vorkultur wurde 16 Stunden bei 33°C bei 240 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Von dieser Vorkultur wurde eine Hauptkultur angeimpft, so daß die Anfangs-OD (660nm) der Hauptkultur 0,1 betrug. Für die Hauptkultur wurde das Medium MM verwendet.

Medium MM

CSL (Corn Steep Liquor)	5 g/l
MOPS (Morpholinopropansulfonsäure)	20 g/l
Glucose (getrennt autoklaviert)	50 g/l
 (NH ₄) ₂ SO ₄	 25 g/l
KH ₂ PO ₄	0,1 g/l
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	1,0 g/l
CaCl ₂ * 2 H ₂ O	10 mg/l
FeSO ₄ * 7 H ₂ O	10 mg/l
MnSO ₄ * H ₂ O	5,0mg/l
Biotin (sterilfiltriert)	0,3 mg/l
Thiamin * HCl (sterilfiltriert)	0,2 mg/l
L-Leucin (sterilfiltriert)	0,1 g/l
CaCO ₃	25 g/l

CSL, MOPS und die Salzlösung wurden mit Ammoniakwasser auf
pH 7 eingestellt und autoklaviert. Anschließend wurden die
5 sterilen Substrat- und Vitaminlösungen zugesetzt, sowie das
trocken autoklavierte CaCO₃.

Die Kultivierung erfolgt in 10 ml Volumen in einem 100 ml
Erlenmeyerkolben mit Schikanen. Es wurde Kanamycin (25
mg/l) und IPTG (1mM/l) zugesetzt. Die Kultivierung erfolgte
10 bei 33°C und 80% Luftfeuchte.

Nach 48 Stunden wurde die OD bei einer Meßwellenlänge von 660 nm mit dem Biomek 1000 (Beckmann Instruments GmbH, München) ermittelt. Die gebildete Lysinmenge wurde mit einem Aminosäureanalysator der Firma Eppendorf-BioTronik
 5 (Hamburg, Deutschland) durch Ionenaustauschchromatographie und Nachsäulenderivatisierung mit Ninhydrindetektion bestimmt.

In Tabelle 1 ist das Ergebnis des Versuchs dargestellt.

Tabelle 1

Stamm	OD (660 nm)	Lysin-HCl g/l
DSM5715	11,8	12,99
DSM5715/pEC- XK99EsigCb2ex	12,8	13,96

10

Kurze Beschreibung der Figuren:

Figur 1: Karte des Plasmids pEC-XK99E

Figur 2: Karte des Plasmids pEC-XK99EsigCb2ex

Die verwendeten Abkürzungen und Bezeichnungen haben
 15 folgende Bedeutung:

Kan:	Kanamycin Resistenz-Gen aph(3')-IIa aus Escherichia coli
HindIII	Schnittstelle des Restriktionsenzym HindIII
XbaI	Schnittstelle des Restriktionsenzym XbaI
KpnI	Schnittstelle des Restriktionsenzym KpnI
Ptrc	trc-Promotor
T1	Terminationsregion T1

T2	Terminationsregion T2
per	Replikationseffektor per
rep	Replikationsregion rep des Plasmides pGA1
lacIq	lacIq-Repressor des lac-Operons von Escherichia coli
sigC	kloniertes sigC-Gen

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Degussa AG

5 <120> Neue für das sigC-Gen kodierende Nukleotidsequenzen

<130> 000441 BT

<140>

10 <141>

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.1

15

<210> 1

<211> 1109

<212> DNA

<213> Corynebacterium glutamicum

20

<220>

<221> CDS

<222> (300)..(878)

<223> sigC-Gen

25

<400> 1

tggaactggt gctccgttgt ggcgggtagt gtttccagaa agctttggac gcattccgcg 60

30

atctacgatac tgggtctgctg ctgacttctc agacattagc attccttcct tttatgaggg 120

ttacctatgg attaagtctg attgatagtc tacatcagaa tgtcacttcg cgccacaaaa 180

taatcagccc ttacgtaaac tgccagcaaa aagacaaaag tatgatactt tttgcccact 240

35

ttgacacccc ctacacacct ttatggtgac cccggtctga actggtattc tgagcaatt 299

gtg aag tca aaa gag cgt aac gac gcc cac gtc acc gag ctg gcc cta 347

Met Lys Ser Lys Glu Arg Asn Asp Ala His Val Thr Glu Leu Ala Leu

1 5 10 15

40

gcc gcc ggc cgt ggc gac cgc gca gct ctc acc gat ttc atc cgg gaa 395

Ala Ala Gly Arg Gly Asp Arg Ala Ala Leu Thr Asp Phe Ile Arg Glu

20 25 30

45

acc caa gac gat gtc tgg cgt ctc ctc gcc cac ctt ggc ggc cac gaa 443

Thr Gln Asp Asp Val Trp Arg Leu Leu Ala His Leu Gly Gly His Glu

35 40 45

50

atc gcc gac gat cta acc caa gaa act tat ctg cgg gtc atg agc gcc 491

Ile Ala Asp Asp Leu Thr Gln Glu Thr Tyr Leu Arg Val Met Ser Ala

50 55 60

55

ctc ccc cgc ttc gca gcg cgc tcc tcg gcg cgt acc tgg cta cta tcg 539

Leu Pro Arg Phe Ala Ala Arg Ser Ser Ala Arg Thr Trp Leu Leu Ser

65 70 75 80

cta gcc cgg cgc gtc tgg gtc gac aac atc cga cac gac atg gca cgc 587

Leu Ala Arg Arg Val Trp Val Asp Asn Ile Arg His Asp Met Ala Arg

85 90 95

5 ccc cgc aaa tcc atc gtc gaa tac gaa gac acc ggt gcc acc gac gcg 635
 Pro Arg Lys Ser Ile Val Glu Tyr Glu Asp Thr Gly Ala Thr Asp Ala
 100 105 110

10 agc aac gca ggc atc tgg tcc gag tgg atc gac gtg cgc acg ctt atc 683
 Ser Asn Ala Gly Ile Trp Ser Glu Trp Ile Asp Val Arg Thr Leu Ile
 115 120 125

15 gac gcc ctc cca ccc gaa cgc cgc gaa gcc ctc atc ctc acc caa gtg 731
 Asp Ala Leu Pro Pro Glu Arg Arg Glu Ala Leu Ile Leu Thr Gln Val
 130 135 140

20 ttg ggc tac acc tac gaa gaa gcc gca aaa atc gcc gac gtc cga gtc 779
 Leu Gly Tyr Thr Tyr Glu Glu Ala Ala Lys Ile Ala Asp Val Arg Val
 145 150 155 160

25 gga aca atc cgt tcc cgc gta gcc cgc gcc aga gcg gac ctc att gct 827
 Gly Thr Ile Arg Ser Arg Val Ala Arg Ala Arg Ala Asp Leu Ile Ala
 165 170 175

30 gca aca gct acc ggt gat tcc tca gcc gaa gat ggc aaa tcc gcc caa 875
 Ala Thr Ala Thr Gly Asp Ser Ser Ala Glu Asp Gly Lys Ser Ala Gln
 180 185 190

35 ggt tagcagatga gctacgtcaa cggcgtaatc ccttaaccag attgctaatt 928
 Gly

40 tacagttcta ttttgctgct cgatcaaagc gactcttacc caccctagaa tcctttgacc 988
 gcacaaacac tttgttttta tctaaaactg aatctttaat ttttacgctc gcagatgatt 1048
 ttcctccagc aatggaagta ataaccocgc cccgaacgac agctcttcga ggtgcgcttc 1108
 c 1109

45 <210> 2
 <211> 193
 <212> PRT
 <213> Corynebacterium glutamicum

50 <400> 2
 Met Lys Ser Lys Glu Arg Asn Asp Ala His Val Thr Glu Leu Ala Leu
 1 5 10 15

55 Ala Ala Gly Arg Gly Asp Arg Ala Ala Leu Thr Asp Phe Ile Arg Glu
 20 25 30

60 Thr Gln Asp Asp Val Trp Arg Leu Leu Ala His Leu Gly Gly His Glu
 35 40 45

65 Ile Ala Asp Asp Leu Thr Gln Glu Thr Tyr Leu Arg Val Met Ser Ala
 50 55 60

70 Leu Pro Arg Phe Ala Ala Arg Ser Ser Ala Arg Thr Trp Leu Leu Ser
 65 70 75 80

Leu Ala Arg Arg Val Trp Val Asp Asn Ile Arg His Asp Met Ala Arg
 85 90 95
 5 Pro Arg Lys Ser Ile Val Glu Tyr Glu Asp Thr Gly Ala Thr Asp Ala
 100 105 110
 Ser Asn Ala Gly Ile Trp Ser Glu Trp Ile Asp Val Arg Thr Leu Ile
 115 120 125
 10 Asp Ala Leu Pro Pro Glu Arg Arg Glu Ala Leu Ile Leu Thr Gln Val
 130 135 140
 Leu Gly Tyr Thr Tyr Glu Glu Ala Ala Lys Ile Ala Asp Val Arg Val
 145 150 155 160
 15 Gly Thr Ile Arg Ser Arg Val Ala Arg Ala Arg Ala Asp Leu Ile Ala
 165 170 175
 20 Ala Thr Ala Thr Gly Asp Ser Ser Ala Glu Asp Gly Lys Ser Ala Gln
 180 185 190
 Gly
 25
 <210> 3
 <211> 28
 <212> DNA
 30 <213> Künstliche Sequenz
 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer
 sigCex1
 35 <400> 3
 acggtacccc ctacacacct ttatggtg 28
 40 <210> 4
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz
 45 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer
 sigCex2
 50 <400> 4
 gctctagagt tgacgtagct catctgct 28

Patentansprüche

1. Isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterien, enthaltend eine für das sigC-Gen kodierende Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe
 - 5 a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,
 - 10 b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70% identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,
 - c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und
 - 15 d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz von a), b) oder c),wobei das Polypeptid bevorzugt die Aktivität des Sigma-Faktors C aufweist.
- 20 2. Polynukleotid gemäß Anspruch 1, wobei das Polynukleotid eine in coryneformen Bakterien replizierbare, bevorzugt rekombinante DNA ist.
3. Polynukleotid gemäß Anspruch 1, wobei das Polynukleotid eine RNA ist.
- 25 4. Polynukleotid gemäß Anspruch 2, enthaltend die Nukleinsäuresequenz wie in SEQ ID No. 1 dargestellt.
5. Replizierbare DNA gemäß Anspruch 2, enthaltend
 - (i) die Nukleotidsequenz, gezeigt in SEQ ID No. 1, oder

- (ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz (i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des genetischen Kodes entspricht, oder
 - (iii) mindestens eine Sequenz, die mit der zur Sequenz (i) oder (ii) komplementären Sequenz hybridisiert, und gegebenenfalls
 - (iv) funktionsneutrale Sinnmutationen in (i).
6. Replizierbare DNA gemäß Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Hybridisierung von Sequenz (iii) unter einer Stringenz entsprechend höchstens 2x SSC durchgeführt wird.
7. Polynukleotidsequenz gemäß Anspruch 2, die für ein Polypeptid kodiert, das die in SEQ ID No. 2 dargestellte Aminosäuresequenz enthält.
8. Coryneforme Bakterien, in denen das sigC-Gen verstärkt, insbesondere überexprimiert wird.
9. Escherichia coli Stamm DH5 α mcr/pEC-XK99EsigCb2ex als DSM 14375 hinterlegt bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, DSMZ, Braunschweig, Deutschland.
10. Corynebacterium glutamicum Stamm DSM5715/pEC-XK99E als DSM 13455 hinterlegt bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, DSMZ, Braunschweig, Deutschland.
11. Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere Lysin, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß man folgende Schritte durchführt:
- a) Fermentation der die gewünschte L-Aminosäure produzierenden coryneformen Bakterien, in denen man zumindest das sigC-Gen oder dafür kodierende

Nukleotidsequenzen verstärkt, insbesondere überexprimiert;

b) Anreicherung der L-Aminosäure im Medium oder in den Zellen der Bakterien, und

5 c) Isolierung der L-Aminosäure.

12. Verfahren gemäß Anspruch 11, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß man Bakterien
einsetzt, in denen man zusätzlich weitere Gene des
Biosyntheseweges der gewünschten L-Aminosäure
10 verstärkt.

13. Verfahren gemäß Anspruch 11, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß man Bakterien
einsetzt, in denen die Stoffwechselwege zumindest
teilweise ausgeschaltet sind, die die Bildung der
15 gewünschten L-Aminosäure verringern.

14. Verfahren gemäß Anspruch 11, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß man einen mit einem
Plasmidvektor transformierten Stamm einsetzt, und der
Plasmidvektor die für das sigC-Gen kodierende
20 Nukleotidsequenz trägt.

15. Verfahren gemäß Anspruch 11, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß man die Expression des
(der) Polynukleotides (e), das (die) für das sigC-Gen
kodiert (kodieren) verstärkt, insbesondere
25 überexprimiert.

16. Verfahren gemäß Anspruch 11, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß man die
regulatorischen Eigenschaften des Polypeptids
(Enzymprotein) erhöht, für das das Polynukleotid sigC
30 kodiert.

17. Verfahren gemäß Anspruch 11, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß man zur Herstellung
von L-Aminosäuren coryneforme Mikroorganismen
fermentiert, in denen man gleichzeitig eines oder
5 mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe
- 17.1 das für die Dihydrodipicolinat-Synthase
kodierende Gen *dapA*,
- 17.2 das für die Glyceraldehyd-3-Phosphat
Dehydrogenase kodierende Gen *gap*,
- 10 17.3 das für die Triosephosphat Isomerase kodierende
Gen *tpi*,
- 17.4 das für die 3-Phosphoglycerat Kinase kodierende
Gen *pgk*,
- 17.5 das für die Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase
15 kodierende Gen *zwf*,
- 17.6 das für die Pyruvat Carboxylase kodierende Gen
pyc,
- 17.7 das für die Malat-Chinon-Oxidoreduktase
kodierende Gen *mgo*,
- 20 17.8 das für eine feed-back resistente
Aspartatkinase kodierende Gen *lysC*,
- 17.9 das für den Lysin-Export kodierende Gen *lysE*,
- 17.10 das für die Homoserin-Dehydrogenase kodierende
Gen *hom*,
- 25 17.11 das für die Threonin-Dehydratase kodierende Gen
ilvA oder das für eine feed back resistente
Threonin-Dehydratase kodierende Allel
ilvA(Fbr),

- 17.12 das für die Acetohydroxysäure-Synthase
kodierende Gen ilvBN,
- 17.13 das für die Dihydroxysäuredehydratase
kodierende Gen ilvD,
- 5 17.14 das für das Zwa1-Protein kodierende Gen zwa1
verstärkt bzw. überexprimiert.
18. Verfahren gemäß Anspruch 11, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß man zur Herstellung
von L-Aminosäuren coryneforme Mikroorganismen
fermentiert, in denen man gleichzeitig eines oder
mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe
- 10 18.1 das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase
kodierende Gen pck,
- 18.2 das für die Glucose-6-Phosphat Isomerase
15 kodierende Gen pgi,
- 18.3 das für die Pyruvat-Oxidase kodierende Gen poxB
- 18.4 das für das Zwa2-Protein kodierende Gen zwa2
abschwächt.
19. Coryneforme Bakterien, die einen Vektor enthalten, der
20 ein Polynukleotid gemäß Anspruch 1 trägt.
20. Verfahren gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 11-18,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß man
Mikroorganismen der Gattung Corynebacterium einsetzt.
21. Verfahren gemäß Anspruch 20, d a d u r c h
25 g e k e n n z e i c h n e t, daß man den
Corynebacterium glutamicum Stamm DH5 α mcr/pEC-
XK99EsigCb2ex einsetzt.

22. Verfahren gemäß Anspruch 20, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß man den
Corynebacterium glutamicum Stamm DSM5715/pEC-XK99E
einsetzt.
- 5 23. Verfahren zum Auffinden von RNA, cDNA und DNA, um
Nukleinsäuren, beziehungsweise Polynukleotide oder Gene
zu isolieren, die für den Sigma-Faktor C kodieren oder
eine hohe Ähnlichkeit mit der Sequenz des sigC-Gens
aufweisen, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
10 daß man das Polynukleotid, enthaltend die
Polynukleotidsequenzen gemäß den Ansprüchen 1, 2, 3
oder 4 als Hybridisierungssonden einsetzt.
24. Verfahren gemäß Anspruch 23, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß man arrays, micro
15 arrays oder DNA-chips einsetzt.

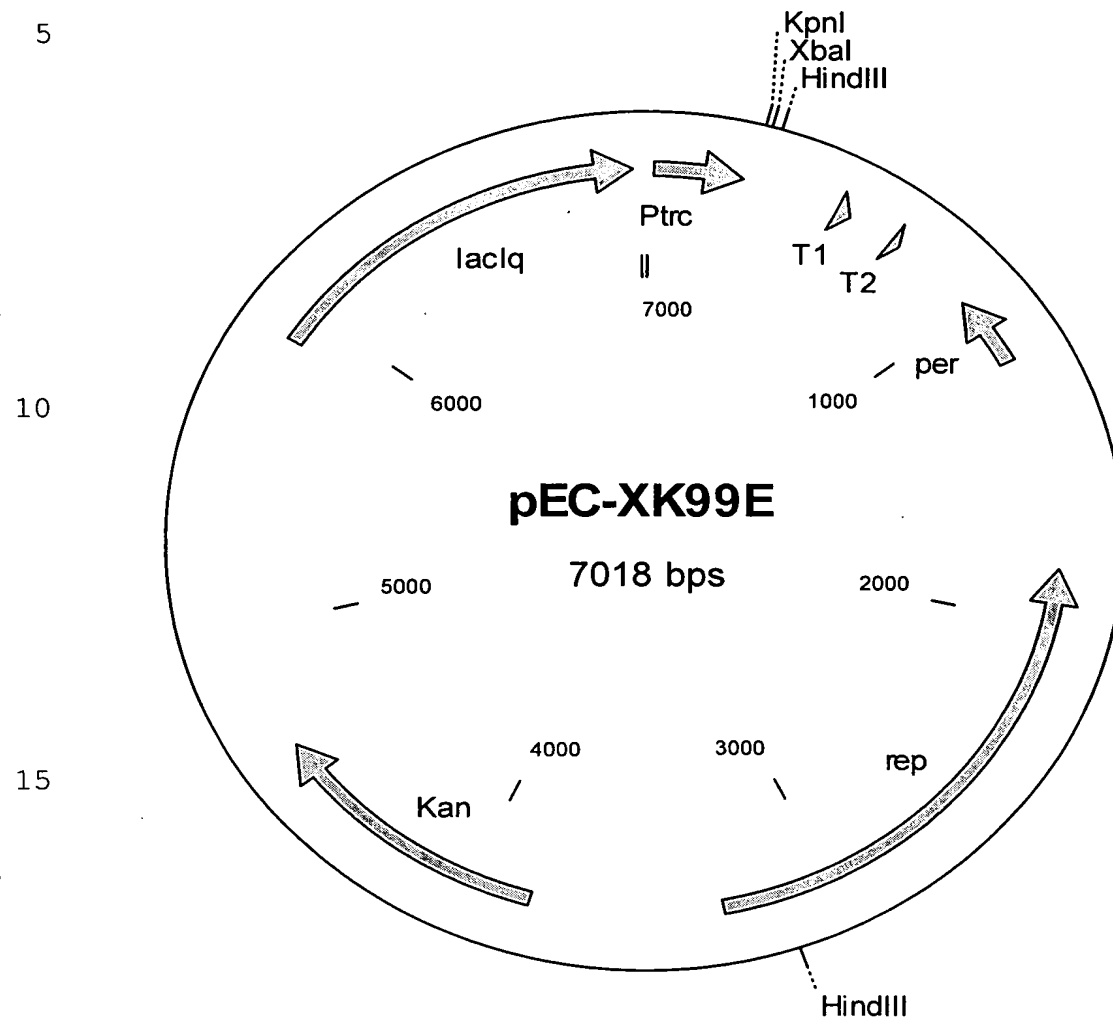
Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein isoliertes Polynukleotid, enthaltend eine Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe

- 5 a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,
- b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70%
10 identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,
- c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und
- d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15
15 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz von a), b) oder c),

und ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren unter Verwendung von coryneformen Bakterien, in denen zumindest das sigC-Gen verstärkt vorliegt, und die
20 Verwendung von Polynukleotiden, die die erfindungsgemäßen Sequenzen enthalten, als Hybridisierungssonden.

Figur 1: Karte des Plasmides pEC-XK99E



Figur 2: Plasmid pEC-XK99EsigCb2ex

5

10

15

20

